

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-261761

(43)公開日 平成6年(1994)9月20日

| (51)Int.Cl. <sup>5</sup>            | 識別記号  | 庁内整理番号                          | F I                     | 技術表示箇所 |
|-------------------------------------|-------|---------------------------------|-------------------------|--------|
| C 1 2 N 15/12<br>5/10               | Z N A |                                 |                         |        |
| C 1 2 P 21/02                       |       | C 8214-4B<br>9050-4B<br>8412-4B | C 1 2 N 15/ 00<br>5/ 00 | A<br>B |
| 審査請求 未請求 発明の数 9 O L (全 13 頁) 最終頁に続く |       |                                 |                         |        |

(21)出願番号 特願平6-11572

(22)出願日 平成6年(1994)2月3日

(31)優先権主張番号 0 1 3 4 6 2

(32)優先日 1993年2月4日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 590005922

イーライ・リリー・アンド・カンパニー  
E L I L I L L Y A N D C O M P A  
N Y

アメリカ合衆国46285インディアナ州イン  
ディアナポリス市、リリー・コーポレイ  
ト・センター(番地の表示なし)

(72)発明者 アン・ホリンズ・ダンツィグ

アメリカ合衆国47933インディアナ州クロ  
ーフォースビル、ツイン・オークス18番

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 哺乳類の流入ペプチド輸送体

(57)【要約】

【構成】 哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードする単離されたDNA化合物および組換えDNAベクター、さらにこれらのベクターで形質転換された宿主細胞および組換えDNA法により哺乳類の流入ペプチド輸送体活性を製造するための方法が提供される。また、流入ペプチド輸送体により細胞中に輸送される化合物を同定するための方法が提供される。

【効果】 本発明の流入ペプチド輸送体によりある化合物の細胞への取り込みを測定することにより、該化合物の経口バイオアベイラビリティを予測することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸残基配列を有するタンパク質をコードしているDNA配列を含む請求項1に記載の単離されたDNA化合物。

【請求項3】 配列番号2のDNA配列を含む請求項2に記載の単離されたDNA化合物。

【請求項4】 請求項1、2または3に記載のDNA配列を含む組換えDNAベクター。

【請求項5】 請求項4に記載の組換えDNAベクターで形質転換された宿主細胞。

【請求項6】 ヒト流入ペプチド輸送体活性を発現させる以下の工程からなる方法：

(1) 以下の(a)および(b)を含む組換えDNA発現ベクターを用いて宿主細胞の形質転換を行い：

(a) 該宿主細胞中で機能するプロモーターおよび翻訳活性化配列；および (b) 該プロモーターおよび翻訳活性化配列から発現するように設置したヒト流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列；

(2) 工程(1)において形質転換された該宿主細胞をヒト流入ペプチド輸送体活性の発現に適当な条件下で培養する。

【請求項7】 宿主細胞が請求項4に記載の組換えDNA発現ベクターで形質転換される請求項6に記載の方法。

【請求項8】 化合物の細胞内への取り込みを測定するための以下の工程からなる方法：

(a) ヒト流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ；そして (b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【請求項9】 細胞が請求項4に記載の組換えDNA発現ベクターで形質転換されている請求項8に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、組換えデオキシリボ核酸(以下「DNA」)法分野に関する。本発明は、プロトン-依存性の流入ペプチド輸送担体(以下「流入ペプチド輸送体」)活性をコードしているDNAを含む単離されたDNA化合物を提供する。さらに、組換えDNAベクターおよび宿主細胞を提供する。

## 【0002】

【従来の技術】 哺乳類細胞において、ペプチドはいくつかの異なる輸送担体により細胞内および細胞外へ輸送される。機能的に、ペプチドの細胞内への流入を担う輸送体およびペプチドの細胞外への流出を担う輸送体が存在する。流入輸送体は小さなペプチドおよび関連の化合物を細胞質中に輸送し、イオン勾配を通してエネルギー源

に間接結合している。流出輸送体は、細胞質からペプチドを除去するように機能するいくつかの異なる輸送体からなる。これらには、多くの腫瘍崩壊物ならびに疎水性ペプチドを除去するP-糖タンパク質が含まれる[EndicottおよびLing, 1989, Annu.Rev.Biochem. 58:137-171; Sharmaら, 1992, J.Biol.Chem. 267: 5731-5734]。

【0003】 本発明は、細胞または細胞小器官へのペプチドの流入を担うペプチド輸送体に関する。このクラスのペプチド輸送体は、胃腸管、腎臓、胎盤および肝臓リソソームに位置する[Ganapathyら, 1991, Indian J.Biochem.Biophys. 28: 317-323; Skopickiら, 1991, Am.J.Physiol. 261: F670-F678; Ganaopathyら, 1981, J.Biol.Chem. 256: 118-124; BirdおよびLloyd, 1990, Biochim.Biophys.Acta 1024: 267-270]。

【0004】 通常、流入ペプチド輸送体は粘膜の上皮細胞の刷子縁に位置する。輸送体の性質は、腸粘膜調製物中、もとの位置で研究され、さらに刷子縁膜小胞、単離された腸細胞および細胞培養物を用いてインビトロで研究されている。ラット、ハムスター、ウサギ、ニワトリ、日本イモリおよびヒトから得た調製物を用いて研究が行われている[GanapathyおよびLeibach, 1991, Curr.Biol. 3: 695-701; Saidら, 1988, Biochim.Biophys.Acta 941: 232-240; Kramerら, 1988, Biochim.Biophys.Acta 939: 167-172; Colongeら, 1990, Am.J.Physiol. 259: G775-G780; ShimadaおよびHoshi, 1986, Jpn.J.Physiol. 36: 451-465; MatthewsおよびBurston, 1984, Clinical Sci., 67: 541-549]。小さなペプチド(ジおよびトリペプチド)、抗生物質(いくつかの経口β-ラクタムを含む)、経口アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質、および経口レニン阻害物質を含む多くの異なる溶質は流入ペプチド輸送体により腸細胞の細胞質中へ輸送される[GanapathyおよびLeibach, 1991, Curr.Biol. 3: 695-701; Okanoら, 1986, J.Biol.Chem. 261: 14130-14134; Nakashimaら, 1984, Biochem.Pharm. 33: 3345-3352; Muranushiら, 1989, Pharm.Res. 6: 308-312; FriedmanおよびAmidon, 1989, Pharm.Res. 6: 1043-1047; FriedmanおよびAmidon, 1990, J.Control.Rel. 13: 141-146; Kramer, 1991, 17th International Congress of Chemotherapy, June 23-28, Berlin, F.R.G., Abstract No.1415]。

【0005】 流入ペプチド輸送体は、β-ラクタムおよびACE阻害物質を含むある種の経口薬物の吸収において中枢の役割を果たす。調べた27種のβ-ラクタム抗生物質のうち、流入ペプチド輸送体はヒトにおいて経口的に吸収されるものとそうでないものを区別することができた[Tabasら, 1991, 31st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No. 164]。さらに、流入ペプチド輸送体は多くの経口β-ラクタム抗生物質を輸送するが非経口のβ-ラクタム抗生物質は輸送しないことが、ヒト腸Caco-2細胞

およびウサギ腸刷子膜を用いた研究において示されている[Dantzigら, 1992, Biochim.Biophys.Acta 1112: 167-173; Dantzigら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Anaheim, CA, Abstract No.1460; Snyderら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy Abstract No.1461; Okanoら, 1986, J.Biol.Chem. 261:14130-14134]。流入ペプチド輸送体の能力を調べてどのACE阻害物質が経口吸収されるかを予測する同様の研究が行われている[FriedmanおよびAmidon, 1989, Pharm.Res. 6:1043-1047]。

【0006】流入ペプチド輸送体は、ナトリウム依存性、エネルギー依存性であり、プロトンを基質と共に共輸送し(「プロトン-依存性」、基質を細胞外に存在するレベルより高いレベルに細胞内に濃縮する能力を呈する[Hoshi, 1986, Ion Gradient-Coupled Transport, IN SERM symposium No.26. Editors: F.AlvaradoおよびC.H.van Os, Elsevier Science Publishers; GanapathyおよびLeibach, 1991, Curr.Opinion Cell Biol. 3:695-701; Ganapathyら, 1991, Indian J.Biochem.Biophys. 28: 317-323]。流入ペプチド輸送体の基質特異性はいくつかの種において調べられており、これらは同一ではないにしても非常に類似しているようである[Inuiら, 1992, J.Pharmacol.Exp.Thera. 260: 482-486; GanapathyおよびLeibach, 1983, J.Biol.Chem. 258: 14189-14192; YasumotoおよびSugiyama, 1980, Agric.Biol.Chem. 44: 1339-1344; Nakashimaら, 1984, Biochem.Pharmacol. 33: 3345-3352; Okanoら, 1986, Biochem.Pharmacol. 35: 1781-1786]。流入ペプチド輸送体の結合部位はわかっておらず、ゆえに、溶質の結合および輸送に必要な絶対的な化学構造の特徴も未知である。基質および阻害物質の構造と活性の相関の研究が行われ、輸送に必要ないくつかの構造的特徴が解明されている[Baiら, 1991, Pharm.Res. 8: 593-599; Snyderら, 1992, 32nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Oct. 11-14, Anaheim, CA, Abstract No.1461]。

【0007】流入ペプチド輸送体活性は、放射ラベルされたペニシリンまたは放射ラベルされたセファレキシム類似体を用いた光親和性標識法により、ウサギ腸粘膜から127,000ダルトンの膜タンパク質として同定されている[Kramer, 1987, Biochim.Biophys.Acta 905:65-74; Kramerら, 1988, Biochem.Pharmacol. 37: 247-2435]。リボソーム中に再構成したウサギ腸粘膜調製物由来の精製127,000ダルトンタンパク質は、結合および輸送活性を与えた[Kramerら, 1990, Biochim.Biophys.Acta 1030: 50-59]。ウサギ流入ペプチド輸送体は、*Xenopus laevis*卵母細胞中に機能的に発現されている[Miyamotoら, 1991, J.Biol.Chem. 266: 4742-4745]。しかし、哺乳類の流入ペプチド輸送体をコードしているク

ローン化遺伝子の構造またはそのいずれかの成分は、いかなる種に対しても報告されていない。

【0008】流入ペプチド輸送体のクローニングは、この機構を使用する経口吸収薬物の迅速な同定および開発を可能にする方法の開発にとって有用であろう。経口バイオアベイラビリティは多くの薬物の非常に望ましい性質である。開発の初期の段階での薬物の経口バイオアベイラビリティの測定は特に有利であろう。現在、薬物は初めに動物モデルにおいて経口バイオアベイラビリティについて評価される。この工程はごく少数の化合物の選択を必要とし、該化合物の合成はこれらのモデルにおいて評価される程度まで拡大しなければならない。化合物がこれらのモデルを用いて経口的に吸収されない場合には、経口バイオアベイラビリティを達成するためにその化合物の類似体を作成されることが多い。この工程は、時間を浪費し、困難であり、費用がかかる。さらに、動物モデルにおいて良く吸収されるがヒトにより吸収されない化合物の多くの例がある。この従来のアプローチを補足するために、他の評価方法が必要とされている。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特に、哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物、哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしている組換えDNA発現ベクター、およびこれらの組換えDNA発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供するものである。これらの組換えDNA発現ベクターおよび宿主細胞は流入ペプチド輸送体活性を発現させるための方法において有用であり、該方法は以下の工程からなる：

(1) 以下の(a)および(b)を含む組換えDNA発現ベクターを用いて宿主細胞の形質転換を行い：

(a) 該宿主細胞中で機能するプロモーターおよび翻訳活性化配列；および (b) 該プロモーターおよび翻訳活性化配列から発現するように設置した哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列；

(2) 工程(1)において形質転換された該宿主細胞を流入ペプチド輸送体活性の発現に適当な条件下で培養する。

【0010】ヒトにおける薬物の経口的な利用可能性を薬物発現過程の初期段階で予測する能力は有利なものであろう。この目的のために、本発明は、流入ペプチド輸送体による、ヒトにおける医薬化合物の経口利用可能性の予測において有用な分析手段を提供する。即ち、本発明の1つの態様は、以下の工程からなる細胞による化合物の取り込みを測定するための方法に関する：

(a) 哺乳類流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ；そして (b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【0011】本発明のこれらの態様および本発明のDNA配列のハイブリダイゼーションプローブとしての使用

10

20

30

40

50

などの他の態様を、以下でさらに詳しく説明し、特許請求の範囲に記載する。

【0012】

【課題を解決するための手段】

#### 定義

コード化配列：遺伝子から発現されるタンパク質のアミノ酸残基配列をコードする遺伝子の読み取り枠中のDNA配列。

DHFR：ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子。

遺伝子：遺伝子産物を発現させるように設置したプロモーター、翻訳活性化配列、コード化配列、および3'調節配列を含むDNAセグメント。

流入ペプチド輸送体活性：内部方向性のプロトン勾配の存在に依存する膜を横切る基質の移動。機能的には、内部方向性のpH-勾配(即ち、細胞または膜小胞の内部より外部の方が酸性度が高い)の存在下、輸送体の既知の基質[例えば、小さなペプチド(例えば、ジおよびトリペプチド)、抗生物質(例えば、セファレキシン)、経口アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害物質、および経口レニン阻害物質]の過剰量の不在または存在下での膜を横切る化合物の輸送を測定することにより活性を測定することができる。

プロモーター：DNAの転写を指令または開始させるDNA配列。

組換えDNA発現ベクター：自律的に複製するかまたは組込みを行うあらゆるDNA物質であり、プラスミドを含むがそれに限定されず、ポリペプチドまたはRNAをコードするDNAセグメントを発現させるように設置したプロモーターおよび他の調節配列を含む。

組換えDNA配列：DNAを導いた宿主染色体を除外したあらゆるDNA配列であって、単離、合成または部分合成されたDNA配列を含む。

制限フラグメント：1またはそれ以上の制限酵素の作用により生じたあらゆる線状DNA分子。

翻訳活性化配列：mRNAへと転写されたときにmRNAのタンパク質への翻訳を促進する調節DNA配列。

本明細書中で用いた全てのヌクレオチドおよびアミノ酸省略形は、米国特許商標局により37 C.F.R. § 1.822(b)(1992)に示されるように認められているものである。

【0013】図面の説明

図面に示した制限酵素および機能地図は、本明細書中に開示した組換えDNAベクターのおおよその表示である。制限部位の情報は網羅的なものではない。地図上に実際に示した部位より多くの所定の型の制限酵素部位が存在することがある。図1はプラスミドpP S J 179の制限酵素部位および機能地図である。図2はプラスミドpP S J 189の制限酵素部位および機能地図である。

【0014】詳細な説明

本発明は、哺乳類流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列を含む単離されたDNA化合物を提供する。流入ペプチド輸送体のアミノ酸配列は配列表中、配列番号1として示す。流入ペプチド輸送体をコードしているDNA配列は配列表中、配列番号2として示す。

【0015】遺伝暗号の縮重の性質により、配列番号1をコードする多くの異なるDNA配列を構築することが可能であることを当業者は認めるであろう。配列番号2により示されるDNA配列は、多くの可能な流入ペプチド輸送体コード化配列のうちのほんの1つである。従って、本発明の好ましいDNA化合物、ベクターおよび形質転換体について以下および添付の実施例に開示する構造は例示のためのものであるにすぎず、本発明の範囲を限定することを意図していない。

【0016】流入ペプチド輸送体の配列が既知となった現在、配列はさまざまな方法により調製することができ、ゆえにどの特定の調製手段にも限定されない。本発明のDNA配列は、DNA合成法、cDNAクローニング、ゲノムクローニング、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、またはこれらのアプローチの組合わせを含むいくつかの方法により製造することができる。これらのそして他の方法は、Maniatisら[「分子クローニング：実験室マニュアル」, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989)]またはF.M.Ausbelら[「分子生物学の最近のプロトコール」, 1989]により開示されている。これら両方の参考文献の内容は、本明細書の一部を構成するものとする。

【0017】本発明のDNA配列は、市販品として入手可能な方法および装置を用いて合成することができる。例えば、固相リン酸トリエステル法を用いて本発明のDNA配列を製造することができる。完全に保護されたDNA構築ブロックを用いる改良リン酸トリエステル法によりDNA配列を合成することができる。このような合成法は、実質的にItakuraら[1977, Science 198: 1056]、Creaら[Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75: 575]およびNarangら[1980, Methods in Enzymology 68: 90]の方法に従って行うことができる。手作業による方法に加えて、ABS 380A DNAシンセサイザー(Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404)などの自動化合成装置を用いてDNA配列を合成することができる。また、DNA配列をポリメラーゼ連鎖反応により生成させることができる。例えば、米国特許番号4,800,159および4,683,202、および欧州特許公開番号0258017(1987年3月2日公開)を参照。

【0018】溶液および固相合成のための方法は広く知られおり、既知のプロトコールに従い、市販品として入手可能なさまざまな自動化合成装置を用いることができる。例えば、StewartおよびYoung[Solid Phase Synthesis 2nd edition, Pierce Chemical Company, 1984]; Ta

mら[1983, J. Am. Chem. Assoc. 105: 6442]; および Merrifieldら[1982, Biochemistry 21: 5020]を参照。

【0019】哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNAを、当分野で周知の方法によりさまざまなベクター中にクローン化することができる。コスミド、プラスミド、バクテリオファージ、バキュロウイルスおよびウイルスを含む多くの適当なベクターを用いることができる。このようなベクターに対する主要な必要条件の1つは、自身を複製し得ることおよび宿主細胞を形質転換し得ることである。好ましくは、該ベクターは本発明のDNA配列によりコードされる哺乳類の流入ペプチド輸送体活性を発現させ得る組換えDNA発現ベクターであろう。通常の発現ベクターは、プロモーター領域、5'非翻訳領域、コード化配列、3'非翻訳領域、複製起点、選択マーカー、転写終結部位を含む。さらに本発明で有用なベクターは、*Escherichia coli*における複製を可能とする配列を含むが、これは他の宿主生物より*E. coli*においてプラスミドDNAを調製することが通常、一層効率的であるからである。

【0020】本発明の新規なDNA配列を発現させるために修飾することができる多種多様の発現ベクターが存在する。本明細書中に例示する特定のベクターは単に実例として挙げているだけであり、本発明の範囲を限定することを意図していない。発現法は、Maniatisら[「分子クローニング: 実験室マニュアル」]または「分子生物学の最近のプロトコル」[16.3-17.44 (1989)]により開示されている。また、*Saccharomyces*における発現法は「分子生物学の最近のプロトコル」(1989)に開示されている。

【0021】本発明実施の際に使用するに適したベクターには、pNHベクター(Stratagene Inc., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037)、pETベクター(Novogen Inc., 565 Science Dr., Madison WI 53711)およびpGEXベクター(Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, NJ 08854)などの原核性ベクターが含まれる。本発明実施の際に有用な真核性ベクターの例には、ベクターpRc/CMV、pRc/RSVおよびpREP (Invitrogen, 11588 Sorrento Valley Rd., San Diego, CA 92121); pVL1392、pVL1393、またはpAC360 (Invitrogen)などのバキュロウイルスベクター; YRP17、YIP5およびYEP24 (New England Biolabs, Beverly, MA)などの酵母ベクター、ならびにpRS403およびpRS413 (Stratagene Inc.)およびpHIL-D1 (Phillips Petroleum Co., Bartlesville, OK 74004)などの*Picchia*ベクターが含まれる。

【0022】本発明の発現ベクターにおいて使用するためのプロモーターには、原核細胞または真核細胞において機能的であるプロモーターが含まれる。原核細胞において機能的なプロモーターには、ラクトース(lac)制御要素、バクテリオファージラムダ(pL)制御要素、アラ

ビノース制御要素、トリプトファン(trp)制御要素、バクテリオファージT7制御要素、およびこれらのハイブリッドが含まれる。真核細胞において機能的であるプロモーターにはEpstein Barrウイルスプロモーター、アデノウイルスプロモーター、SV40プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、サイトメガロウイルス、AcMNPV多面体プロモーターなどのバキュロウイルスプロモーター、アルコールオキシダーゼプロモーターなどの*Picchia*プロモーター、gal4誘導性プロモーターおよびPGK構成性プロモーターなどの*Saccharomyces*プロモーターが含まれる。

【0023】さらに、本発明のベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を容易にする多数の各種マーカーのうち任意の1つを含むことができる。このようなマーカーには、温度感受性、薬物耐性、または宿主生物の表現型特性と関連した酵素に関係する遺伝子が含まれる。

【0024】哺乳類の流入ペプチド輸送体活性をコードしているDNA配列をベクター中に挿入した後に、そのベクターを用いて宿主細胞を形質転換させることができる。通常、宿主細胞には、本発明のDNAを含むベクターで形質転換され得る原核細胞または真核細胞を含む細胞性生物が包含される。細胞の形質転換およびトランスフェクションの方法は当分野で周知であり、Maniatisら(1989)または「分子生物学の最近のプロトコル」(1989)などの一般的な参考文献中に見出すことができる。

【0025】本発明は特定の宿主細胞に対する使用に限定されない。本発明のベクターは多くの宿主細胞中に導入し発現させることができる。本発明の形質転換された宿主細胞は、プロモーターの誘導、形質転換体の選択または遺伝子の増幅のために適当に修飾された通常の培養培地中で培養することができる。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞について既に用いられている条件であり、当業者には明らかであろう。

【0026】特定の宿主細胞の選択は、本発明の流入ペプチド輸送体活性-コード化DNA化合物を発現させるために用いる特定の発現ベクターにある程度依存する。本発明のベクターの宿主細胞への導入の後に、選択可能な表現型を基にして形質転換体を選択することができる。この選択可能な表現型は、発現ベクター上に存在する選択可能なマーカーにより付与することができる。

【0027】適当な宿主細胞には、例えば*Escherichia coli*および*Bacillus subtilis*などの原核細胞; チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-DHFR-[American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776から受託番号ATCC CRL-9096の下に入手可能]、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-K1 (ATCC CCL-61)、シリアンハムスター細胞AV12 (ATCC CRL 1573)、ヒトリンパ球CCRF-CEM細胞、ヒト神経芽腫細胞、ブタ腎臓細胞(LLC

-PK<sub>1</sub> (ATCC CL101)および肝臓、脳、皮膚および副腎腺由来の細胞などの真核細胞; *Saccharomyces cerevisiae* および *Picchia pastoris* を含む酵母細胞; *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC CRL 1711) などのアワヨトウ幼虫細胞を含む昆虫細胞; *Aspergillus* 種を含む菌類細胞が含まれる。

【0028】原核細胞および真核細胞における発現は、Maniatisら(1989)およびKaufmann[「遺伝子工学の原理および方法」, J.K.Setlow編, Plenum Press 9: 155, (1988)]により開示されている。酵母の発現はBarrら[「酵母の遺伝子工学」, Butterworth編, Boston 1989]により開示されている。昆虫細胞における発現はMaeda[1989, 「昆虫学の年報」, 34: 351]により開示されている。

【0029】配列番号2により示されるDNA配列は、Caco-2セルラインのmRNAから調製したcDNAク

ローンから得た。Caco-2セルラインは、流入ペプチド輸送体により抗生物質を取り込むことが示されているヒト結腸腺癌セルラインである[DantzigおよびBergin, 1990, *Biochim.Biophys.Acta* 1027: 211-217; Dantzigら, 1992, *Biochim.Biophys.Acta* 1112: 167-173]。Caco-2細胞はATCCから受託番号ATCC HTB37の下に入手可能である。

【0030】本発明の例示ベクターを*Escherichia coli* RR1または*E.coli* DH5 $\alpha$ 細胞中に導入し、Northern Regional Research Laboratories (NRRL) (Peoria, Illinois 61604)に1993年1月21日に寄託して永続的な貯蔵培養物コレクションの一部とした。特定の培養物および受託番号を表1に示す。

【表1】

表1

| 培養物                                     | 受託番号         |
|---|--------------|
| <i>E.coli</i> K12 DH5 $\alpha$ /pPSJ179 | NRRL B-21041 |
| <i>E.coli</i> K12 RR1/pPSJ189           | NRRL B-21042 |

【0031】培養物を入手し、常法によりプラスミドを単離する。次いで、哺乳類流入ペプチド輸送体を産生させるためにこのプラスミドを直接宿主細胞中に導入することができる。

【0032】プラスミドpPSJ179は長さが約8500塩基対であり、Caco-2細胞由来の流入ペプチド輸送体をコードしているDNAを含有する。プラスミドpPSJ179は、流入ペプチド輸送体-コード化DNAを含む3.4kb *Xba*I-*Hind*III cDNA制限酵素フラグメントを、市販品として入手可能なベクターpRc/RSV (Invitrogen)中にクローニングすることにより構築した。流入ペプチド輸送体は内部に*Hind*III制限酵素部位を有しているから、3.4kb *Xba*I-*Hind*IIIフラグメントのクローニングにおいて部分的な制限酵素消化を用いた。プラスミドpPSJ179は、*Escherichia coli*における選択のためのアンピシリン耐性遺伝子、真核細胞における選択のためのネオマイシン耐性遺伝子およびラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーターから発現するように設置した流入ペプチド輸送体遺伝子を含有する。プラスミドpPSJ179の制限酵素および機能地図は添付の図1に示す。

【0033】プラスミドpPSJ189もまた本発明のベクターの例である。プラスミドpPSJ189は約12.2キロ塩基の大きさである。プラスミドpPSJ189は、プラスミドpHDの修飾された変異体中にクローン化された流入ペプチド輸送体-コード化DNAを含む3.4キロ塩基対の*Kpn*I-*Spe*I制限フラグメントを含有する。プラスミドpHDは、流入ペプチド輸送体コード化DNAを含んでいる3.4キロ塩基対の*Kpn*I-*Spe*I制限フラグメントのクローニングを容易にするた

めの制限酵素部位を含むよう修飾した。プラスミドpHDは欧州特許公開番号0245949(1987年11月19日公開)中に開示されている。プラスミドpPSJ189は、*Escherichia coli*における選択のためのアンピシリン耐性遺伝子、真核細胞における選択のためのハイグロマイシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子、および流入ペプチド輸送体遺伝子の発現のために設置したBKエンハンサーおよびアデノウイルス主要後期プロモーターを含有する。プラスミドpPSJ189の制限酵素および機能地図を添付の図2に示す。

【0034】流入ペプチド輸送体コード化DNAはプラスミドpPSJ179およびpPSJ189からさまざまな制限酵素フラグメントとして切り出すことができ、多くの発現ベクター中にクローン化し得ることを当業者は認めるであろう。例えば、流入ペプチド輸送体コード化活性DNAをプラスミドpPSJ179から3.4キロ塩基対*Hind*III-*Xba*I制限酵素フラグメントとして、またはプラスミドpPSJ189から3.4キロ塩基対の*Kpn*I-*Spe*I制限酵素フラグメントとして切り出すことができる。プラスミドDNA内の多数の制限酵素部位の存在のゆえに、完全な流入ペプチド輸送体をコードするDNAフラグメントを調製するために部分的な制限酵素消化が必要であろうことを当業者は認めるであろう。流入ペプチド輸送体コード化活性DNAを含むさまざまな制限酵素フラグメントを同定、単離およびクローニングするための方法は当分野で周知である。

【0035】本明細書の開示に基づき、本発明の流入ペプチド輸送体に構造が類似している他の輸送体を、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法、DNAハイブリダイゼーションなどの周知の方法またはこれらの方法の組み合わせ

せにより同定することができる。流入ペプチド輸送体は細胞外領域(およそ配列番号1のアミノ酸残基1~778)およびトランスメンブラン領域(およそ配列番号1のアミノ酸残基778~809)からなる。細胞外領域は、カドヘリンとして知られるタンパク質のファミリーに非常に関係がある[Takeichi, M., 1990, Annu. Rev. Biochem. 59: 237-252]。カドヘリンファミリーは保存性の高い細胞外および細胞内領域を有する。しかし、流入ペプチド輸送体は、カドヘリンの機能的な活性に必要であることが示されている保存性の細胞内領域を有していない[Klinter, 1992, Cell 69: 225-236]。カドヘリンと流入ペプチド輸送体の間のこの差異に基づくハイブリダイゼーション法を用いて、流入ペプチド輸送体に関係したタンパク質を同定することができる。

【0036】あるハイブリダイゼーション法の下に、a) カドヘリンファミリーおよび流入ペプチド輸送体の保存性細胞外領域、b) カドヘリンファミリーの保存性細胞内領域に特異的なプローブを得る。PCR法を用いてこのようなプローブを得ることができる。この場合において、鋳型DNAはゲノムDNA、または流入ペプチド輸送体活性およびカドヘリンを発現する異なる組織型のセルラインから得たcDNAであってもよい。鋳型DNAのための可能な供給源には、腎臓、腸管、脾臓由来の細胞または「血液-脳」関門由来の内皮細胞が含まれる。

【0037】カドヘリンファミリーおよび流入ペプチド輸送体の保存性の高い細胞外領域に特異的なプローブを最初にハイブリダイゼーション実験において用いて、カドヘリンおよび他のペプチド輸送体の細胞外領域を有する遺伝子を同定する。次いで、カドヘリンの細胞内領域から得たプローブをハイブリダイゼーションプローブとして用いて、カドヘリンをコードする遺伝子を同定する。細胞外領域に対するプローブと反応するが細胞内領域に対するプローブとは反応しない遺伝子は、流入ペプチド輸送体の候補に相当する。これらの遺伝子を組換えDNA発現ベクター中にクローン化して適当な宿主細胞中に導入する。次いで、形質転換された宿主細胞を流入ペプチド輸送体活性の発現についてアッセイする。

【0038】異種ハイブリダイゼーション法を用いて同じ成果を挙げることができる。この場合には、カドヘリンの細胞外および細胞内部分を表すDNAフラグメントを用いて、可能性のある流入ペプチド輸送体をカドヘリンと区別する。

【0039】本発明の流入ペプチド輸送体をコードしているDNA、またはその任意の部分に基づくプローブを利用する従来のハイブリダイゼーション法を用いてペプチド輸送活性をコードしている他の遺伝子を同定することができる。例えば、配列番号2またはその一部に基づくプローブを用いてペプチド輸送活性を有する遺伝子を同定することができる。また、配列番号1のアミノ酸配列またはその一部に基づく縮重したプローブを用いてペ

プチド輸送活性を有する遺伝子を同定することができる。ハイブリダイゼーション法はManiatisら(1989)が開示している。

【0040】上に示したように、本発明は流入ペプチド輸送体による化合物の取り込みを測定するための方法を提供する。この方法はヒトにおける流入ペプチド輸送体による化合物の経口バイオアベイラビリティの予測において有用である。多種多様の化合物を流入ペプチド輸送体による取り込みについて試験することができる。このような化合物の例には、小さなペプチドおよび治療薬物、例えば抗生物質、ACE阻害物質、およびレニン阻害物質が含まれる。これらの化合物は単なる例示である。この方法は、流入ペプチド輸送体により取り込まれる能力を試験するために事実上いかなる化合物にも適用できる。従って、1つの態様において本発明は、以下の工程からなる、細胞中への化合物の取り込みを測定するための方法を提供する：

- a) 哺乳類流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞と該化合物を接触させ、そして、
- b) 該細胞中への該化合物の輸送についてアッセイする。

【0041】本発明の方法において有用な流入ペプチド輸送体活性の発現をもたらす組換えDNA発現ベクターの例は上に記載した。このような組換えDNA発現ベクターは、発現のために選択される宿主細胞における流入ペプチド輸送体活性の最適な発現のために調整することができる。

【0042】上に記載した細胞を含む多種多様の細胞をこの方法において用いることができる。本発明の組換えDNA発現ベクターでの形質転換の前に流入ペプチド輸送体活性を欠く細胞は本法において特に有用である。本発明の組換えDNA発現ベクターでの形質転換の前に測定可能な化合物の取り込みを有する細胞もまた有用である。どちらの場合においても、流入ペプチド輸送体活性をコードしている組換えDNA発現ベクターで形質転換された細胞を、該細胞への試験化合物の輸送の増大についてアッセイすることができる。

【0043】本発明のこの態様において有用な細胞には、例えば*Escherichia coli*および*Bacillus subtilis*などの原核細胞；チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-DHFR<sup>-</sup> [American Type Culture Collection(ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776から受託番号ATCC CRL-9096の下に入手可能]、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHO-K1(ATCC CCL-61)、シリアンハムスター細胞AV12(ATCC CRL 1573)、ヒトリンパ球CCRF-CEM細胞、ヒト神経芽腫細胞、ブタ腎臓細胞(LLC-PK<sub>1</sub>, ATCC CL101)および肝臓、脳、皮膚および副腎腺由来の細胞などの真核細胞；*Saccharomyces cerevisiae*および*Pichia pastoris*を含

む酵母細胞; *Spodoptera frugiperda* Sf9 (ATCC CRL 1711) などのアワヨトウ幼虫細胞を含む昆虫細胞; *Aspergillus* 種を含む菌類細胞が含まれる。また、上に言及した細胞のペプチド輸送欠失突然変異体が本発明の方法において有用であろう。このようなペプチド輸送欠失突然変異体は、*Escherichia coli* [DeFeliceら, 1973, *J. Bacteriol.* 116: 751-7560] および酵母 [Islandら, 1991, *Curr. Genet.* 20: 457-463; Marderら, 1978, *J. Bacteriol.* 136: 1174-1177] について開示されている。

【0044】上に示したように、流入ペプチド輸送体を発現させるために用いる特定のベクターは、利用する宿主細胞に従い異なるであろう。

【0045】流入ペプチド輸送体活性を発現しているトランスフェクタント細胞による化合物の取り込みはさまざまな方法により測定することができる。これらの方法には、宿主細胞内の試験化合物の出現の測定、すなわち該細胞を溶解して溶解物サンプルを高速液体クロマトグラフィーによりまたは該化合物が放射ラベルされている場合には放射活性の検出により化合物を分析することによる測定が含まれる。また、特定の試験化合物に関係する他の特性を測定することができる。即ち、特定の化合物をスクリーニングするために通常用いられるアッセイを利用することができる。例えば、レセプターアッセイにおいてレセプターに対するリガンドの結合を置換(または増強)する化合物の能力、関係のある酵素を阻害(または刺激)する化合物の能力、生物の増殖を阻害(または刺激)する化合物の能力、または試験化合物が有するであろうある種の他の特性を利用することができる。BradnerおよびClaridge [1984, 「抗新生物薬におけるスクリーニング系」, W.A. Remers編, Wiley-Interscience Publ., John WileyおよびSons, Inc. N.Y., NY] により開示されているアッセイを含むさまざまなアッセイを用いて流入ペプチド輸送体活性を測定することができる。

#### 【0046】

【実施例】以下に示す実施例は本発明の一層の理解を助けることを意図している。用いられる特定の物質、種および条件は、本発明をさらに詳しく説明することを意図しており、本発明の正当な範囲を限定しようとするものではない。DNAの操作および分析のための方法は、本質的にManiatisら(1989)により開示されているように行った。制限酵素反応のための条件は、製造者[Boehringer Mannheim (BM), Indianapolis, IN; New England Biolabs (NEB), Beverly, MA; Bethesda Research Labs (BRL), Gaithersburg, MD] により推奨されている条件を使用した。

#### 【0047】実施例1

チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1, ATCC CCL 61)を、Stratagene哺乳動物トランスフェクションキット(Stratagene Catalog # 200285)中に記載されているカルシウム沈殿プロトコルを用いてプラスミドpP

SJ179でトランスフェクションした。プラスミドpPSJ179は、*Escherichia coli* K12 DH5 $\alpha$ /pPSJ179(NRRL B-21041)から通常のアルカリ-SDS法(Maniatisら, 1989)を用いて単離することができる。カルシウム沈殿プロトコルのトランスフェクション法を以下のように行った。ほぼ全面成長のCHO-K1細胞(100mm培養皿、プレーティングの1日後)を、20 $\mu$ gのカルシウム-沈殿したDNAサンプルと共に37℃で20分間インキュベートした。DNAサンプルはプラスミドpPSJ179または対照としてのプラスミドpRc/RSVのどちらかであった。続いて、該細胞を10%ウシ胎児血清(Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT 84321)を含むF12培地中で3日間増殖させた。この後に、培地を選択薬物、G-418スルフェート(Gibco, Grand Island, NY)を300 $\mu$ g/mlで含む増殖培地と置換し、細胞を3%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、37℃で13日間増殖させた。後の研究のために選択したコロニーを、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中、選択した時間、37℃の選択培地において増殖させた。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)および流入ペプチド輸送体に対して反応性のモノクローナル抗体を用いて、トランスフェクタントを流入ペプチド輸送体の発現について評価した。対照より高いレベルの流入ペプチド輸送体抗原を発現したクローンを輸送研究のために選択した。別法によれば、Dantzigら[1990, *Biochim. Biophys. Acta* 1027: 211-217]により開示された方法を用いて流入ペプチド輸送体の発現についてクローンを選択する。さらに、配列番号1に基づくプローブを利用するハイブリダイゼーション法を用いて、流入ペプチド輸送体をコードしているDNAを含むクローンを同定することができる。

#### 【0048】実施例2

実施例1で選択したクローンを抗生物質セファレキシンの取り込みについて評価した。セファレキシンはEli Lilly and Company (Indianapolis, IN)から入手可能である。トランスフェクションされたCHO-K1細胞(ウエル当たり $\sim 0.5$ から $1 \times 10^5$ 細胞)を上記のようにCostar 24-ウエルプレート中で3日間増殖させた。全面成長細胞を25mM HEPES、pH 7.4を含むアール平衡塩類溶液(Gibco, Grand Island, NY) (Trans-EBSS)で洗浄し、37℃で45分間インキュベートし、次いでTrans-EBSSを吸引により除去した。この細胞を120mM塩化コリン、25mM MES、pH 6.0を含むナトリウム不含のアール平衡塩類溶液(ナトリウム不含、Trans-EBSS)中、1mM [<sup>14</sup>C]セファレキシンの存在下でインキュベートした。続いて、細胞を氷冷Trans-EBSS、pH 7.4で洗浄し、0.2N NaOH中で溶解させ、一部をシンチレーション計数測定のために採取した。

【0049】代表的なトランスフェクタント(クローン



9)は対照より有意に高い $^{14}\text{C}$ セファレキシンの取り込みを示した。後の研究により、このトランスフェクタントによる1mMのセファレキシンの取り込みは、流入ペプチド輸送体による取り込みと競合するジペプチドであるGly-L-Pro(GP)の50mMの存在により阻害されることが示された。細胞を1mM $^{14}\text{C}$ セファレキシンおよびGPと共にインキュベートすることにより、

代表的なトランスフェクタント(クローン9)における薬物の取り込みは対照細胞のレベルまで減少した。さらに、対照細胞による1mM $^{14}\text{C}$ セファレキシンの輸送はGly-L-Proジペプチドにより阻害されなかった。これらの研究の結果を表2に示す。

【表2】

表2

| サンプル       | $^{14}\text{C}$ -セファレキシンの取り込み<br>(nmol/mg全細胞タンパク質) |
|------------|--|
| クローン9      | 6.6 ± 0.3  |
| クローン9 + GP | 4.5 ± 0.03   |
| 対照         | 3.3 ± 0.6  |
| 対照 + GP    | 4.7 ± 0.4  |

【0050】

【配列表】

【0051】配列番号：1

配列の長さ：832

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

```

Met Ile Leu Gln Ala His Leu His Ser Leu Cys Leu Leu Met Leu
1           5           10           15
Tyr Leu Ala Thr Gly Tyr Gly Gln Glu Gly Lys Phe Ser Gly Pro
20           25           30
Leu Lys Pro Met Thr Phe Ser Ile Tyr Glu Gly Gln Glu Pro Ser
35           40           45
Gln Ile Ile Phe Gln Phe Lys Ala Asn Pro Pro Ala Val Thr Phe
50           55           60
Glu Leu Thr Gly Glu Thr Asp Asn Ile Phe Val Ile Glu Arg Glu
65           70           75
Gly Leu Leu Tyr Tyr Asn Arg Ala Leu Asp Arg Glu Thr Arg Ser
80           85           90
Thr His Asn Leu Gln Val Ala Ala Leu Asp Ala Asn Gly Ile Ile
95           100          105
Val Glu Gly Pro Val Pro Ile Thr Ile Glu Val Lys Asp Ile Asn
110          115          120
Asp Asn Arg Pro Thr Phe Leu Gln Ser Lys Tyr Glu Gly Ser Val
125          130          135
Arg Gln Asn Ser Arg Pro Gly Lys Pro Phe Leu Tyr Val Asn Ala
140          145          150
Thr Asp Leu Asp Asp Pro Ala Thr Pro Asn Gly Gln Leu Tyr Tyr
155          160          165
Gln Ile Val Ile Gln Leu Pro Met Ile Asn Asn Val Met Tyr Phe
170          175          180
Gln Ile Asn Asn Lys Thr Gly Ala Ile Ser Leu Thr Arg Glu Gly
185          190          195
Ser Gln Glu Leu Asn Pro Ala Lys Asn Pro Ser Tyr Asn Leu Val
200          205          210
Ile Ser Val Lys Asp Met Gly Gly Gln Ser Glu Asn Ser Phe Ser
215          220          225

```

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| Asp Thr Thr Ser Val Asp Ile Ile Val Thr Glu Asn Ile Trp Lys |     |     |
| 230   | 235 | 240 |
| Ala Pro Lys Pro Val Glu Met Val Glu Asn Ser Thr Asp Pro His |     |     |
| 245   | 250 | 255 |
| Pro Ile Lys Ile Thr Gln Val Arg Trp Asn Asp Pro Gly Ala Gln |     |     |
| 260   | 265 | 270 |
| Tyr Ser Leu Val Asp Lys Glu Lys Leu Pro Arg Phe Pro Phe Ser |     |     |
| 275   | 280 | 285 |
| Ile Asp Gln Glu Gly Asp Ile Tyr Val Thr Gln Pro Leu Asp Arg |     |     |
| 290   | 295 | 300 |
| Glu Glu Lys Asp Ala Tyr Val Phe Tyr Ala Val Ala Lys Asp Glu |     |     |
| 305   | 310 | 315 |
| Tyr Gly Lys Pro Leu Ser Tyr Pro Leu Glu Ile His Val Lys Val |     |     |
| 320   | 325 | 330 |
| Lys Asp Ile Asn Asp Asn Pro Pro Thr Cys Pro Ser Pro Val Thr |     |     |
| 335   | 340 | 345 |
| Val Phe Glu Val Gln Glu Asn Glu Arg Leu Gly Asn Ser Ile Gly |     |     |
| 350   | 355 | 360 |
| Thr Leu Thr Ala His Asp Arg Asp Glu Glu Asn Thr Ala Asn Ser |     |     |
| 365   | 370 | 375 |
| Phe Leu Asn Tyr Arg Ile Val Glu Gln Thr Pro Lys Leu Pro Met |     |     |
| 380   | 385 | 390 |
| Asp Gly Leu Phe Leu Ile Gln Thr Tyr Ala Gly Met Leu Gln Leu |     |     |
| 395   | 400 | 405 |
| Ala Lys Gln Ser Leu Lys Lys Gln Asp Thr Pro Gln Tyr Asn Leu |     |     |
| 410   | 415 | 420 |
| Thr Ile Glu Val Ser Asp Lys Asp Phe Lys Thr Leu Cys Phe Val |     |     |
| 425   | 430 | 435 |
| Gln Ile Asn Val Ile Asp Ile Asn Asp Gln Ile Pro Ile Phe Glu |     |     |
| 440   | 445 | 450 |
| Lys Ser Asp Tyr Gly Asn Leu Thr Leu Ala Glu Asp Thr Asn Ile |     |     |
| 455   | 460 | 465 |
| Gly Ser Thr Ile Leu Thr Ile Gln Ala Thr Asp Ala Asp Glu Pro |     |     |
| 470   | 475 | 480 |
| Phe Thr Gly Ser Ser Lys Ile Leu Tyr His Ile Ile Lys Gly Asp |     |     |
| 485   | 490 | 495 |
| Ser Glu Gly Arg Leu Gly Val Asp Thr Asp Pro His Thr Asn Thr |     |     |
| 500   | 505 | 510 |
| Gly Tyr Val Ile Ile Lys Lys Pro Leu Asp Phe Glu Thr Ala Ala |     |     |
| 515   | 520 | 525 |
| Val Ser Asn Ile Val Phe Lys Ala Glu Asn Pro Glu Pro Leu Val |     |     |
| 530   | 535 | 540 |
| Phe Gly Val Lys Tyr Asn Ala Ser Ser Phe Ala Lys Phe Thr Leu |     |     |
| 545   | 550 | 555 |
| Ile Val Thr Asp Val Asn Glu Ala Pro Gln Phe Ser Gln His Val |     |     |
| 560   | 565 | 570 |
| Phe Gln Ala Lys Val Ser Glu Asp Val Ala Ile Gly Thr Lys Val |     |     |
| 575   | 580 | 585 |
| Gly Asn Val Thr Ala Lys Asp Pro Glu Gly Leu Asp Ile Ser Tyr |     |     |
| 590   | 595 | 600 |

|   |     |     |
|---|-----|-----|
| Ser Leu Arg Gly Asp Thr Arg Gly Trp Leu Lys Ile Asp His Val |     |     |
| 605   | 610 | 615 |
| Thr Gly Glu Ile Phe Ser Val Ala Pro Leu Asp Arg Glu Ala Gly |     |     |
| 620   | 625 | 630 |
| Ser Pro Tyr Arg Val Gln Val Val Ala Thr Glu Val Gly Gly Ser |     |     |
| 635   | 640 | 645 |
| Ser Leu Ser Ser Val Ser Glu Phe His Leu Ile Leu Met Asp Val |     |     |
| 650   | 655 | 660 |
| Asn Asp Asn Pro Pro Arg Leu Ala Lys Asp Tyr Thr Gly Leu Phe |     |     |
| 665   | 670 | 675 |
| Phe Cys His Pro Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Ile Phe Glu Ala |     |     |
| 680   | 685 | 690 |
| Thr Asp Asp Asp Gln His Leu Phe Arg Gly Pro His Phe Thr Phe |     |     |
| 695   | 700 | 705 |
| Ser Leu Gly Ser Gly Ser Leu Gln Asn Asp Trp Glu Val Ser Lys |     |     |
| 710   | 715 | 720 |
| Ile Asn Gly Thr His Ala Arg Leu Ser Thr Arg His Thr Asp Phe |     |     |
| 725   | 730 | 735 |
| Glu Glu Arg Ala Tyr Val Val Leu Ile Arg Ile Asn Asp Gly Gly |     |     |
| 740   | 745 | 750 |
| Arg Pro Pro Leu Glu Gly Ile Val Ser Leu Pro Val Thr Phe Cys |     |     |
| 755   | 760 | 765 |
| Ser Cys Val Glu Gly Ser Cys Phe Arg Pro Ala Gly His Gln Thr |     |     |
| 770   | 775 | 780 |
| Gly Ile Pro Thr Val Gly Met Ala Val Gly Ile Leu Leu Thr Thr |     |     |
| 785   | 790 | 795 |
| Leu Leu Val Ile Gly Ile Ile Leu Ala Val Val Phe Ile Arg Ile |     |     |
| 800   | 805 | 810 |
| Lys Lys Asp Lys Gly Lys Asp Asn Val Glu Ser Ala Gln Ala Ser |     |     |
| 815   | 820 | 825 |
| Glu Val Lys Pro Leu Arg Ser                                 |     |     |
| 830   | 832 |     |

【0052】配列番号：2

配列の長さ：2499

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列：

|  |     |
|--|-----|
| ATGATACTTC AGGCCCATCT TCACTCCCTG TGTCTTCTTA TGCTTTATTT | 50  |
| GGCAACTGGA TATGGCCAAG AGGGGAAGTT TAGTGGACCC CTGAAACCCA | 100 |
| TGACATTTTC TATTTATGAA GGCCAAGAAC CGAGTCAAAT TATATTCCAG | 150 |
| TTTAAGGCCA ATCCTCCTGC TGTGACTTTT GAACTAACTG GGGAGACAGA | 200 |
| CAACATATTT GTGATAGAAC GGGAGGGACT TCTGTATTAC AACAGAGCCT | 250 |
| TGGACAGGGA AACAAGATCT ACTCACAATC TCCAGGTTGC AGCCCTGGAC | 300 |
| GCTAATGGAA TTATAGTGGG GGGTCCAGTC CCTATCACCA TAGAAGTGAA | 350 |
| GGACATCAAC GACAATCGAC CCACGTTTCT CCACTCAAAG TACGAAGGCT | 400 |
| CAGTAAGGCA GAACTCTCGC CCAGGAAAGC CCTTCTTGTA TGCAATGCC  | 450 |
| ACAGACCTGG ATGATCCGGC CACTCCCAAT GGCCAGCTTT ATTACCAGAT | 500 |
| TGTATCCAG CTTCCTATGA TCAACAATGT CATGTACTTT CAGATCAACA  | 550 |
| ACAAAACGGG AGCCATCTCT CTTACCCGAG AGGATCTCA GGAATTGAAT  | 600 |
| CCTGCTAAGA ATCCTTCCTA TAATCTGGTG ATCTCAGTGA AGGACATGGG | 650 |
| AGGCCAGAGT GAGAATTCCT TCACTGATAC CACATCTGTG GATATCATAG | 700 |

21

22

|                        |                       |            |      |
|------------------------|-----------------------|------------|------|
| TCACAGAGAA TATTTGGAAG  | GCACCAAAAC CTGTGGAGAT | GGTGGAAAAC | 750  |
| TCAACTGATC CTCACCCCAT  | CAAAATCACT CAGGTGCGGT | GGAATGATCC | 800  |
| CGGTGCACAA TATTCCTTAG  | TTGACAAAGA GAAGCTGCCA | AGATTCCCAT | 850  |
| TTTCAATTGA CCAGGAAGGA  | GATATTTACG TGAATCAGCC | CITGGACCGA | 900  |
| GAAGAAAAGG ATGCATATGT  | TTTTTATGCA GTTGCAAAGG | ATGAGTACGG | 950  |
| AAAACCACTT TCATATCCGC  | TGGAAATTCA TGTAAAAGTT | AAAGATATTA | 1000 |
| ATGATAATCC ACCTACATGT  | CCGTCACCAG TAACCGTATT | TGAGGTCCAG | 1050 |
| GAGAATGAAC GACTGGGTAA  | CACTATCGGG ACCCTTACTG | CACATGACAG | 1100 |
| GGATGAAGAA AATACTGCCA  | ACAGTTTCTT AACTACAGG  | ATTGTGGAGC | 1150 |
| AAACTCCCAA ACTTCCCATG  | GATGGACTCT TCCTAATCCA | AACCTATGCT | 1200 |
| GGAATGTTAC AGTTAGCTAA  | ACAGTCCTTG AAGAAGCAAG | ATACTCCTCA | 1250 |
| GTACAACTTA ACGATAGAGG  | TGTCTGACAA AGATTTCAG  | ACCCTTTGTT | 1300 |
| TTGTGCAAAAT CAACGTTATT | GATATCAATG ATCAGATCCC | CATCTTTGAA | 1350 |
| AAATCAGATT ATGGAACCT   | GACTCTTGCT GAAGACACAA | ACATTGGGTC | 1400 |
| CACCATCTTA ACCATCCAGG  | CCACTGATGC TGATGAGCCA | TTTACTGGGA | 1450 |
| GTTCTAAAAT TCTGTATCAT  | ATCATAAAGG GAGACAGTGA | GGGACGCCTG | 1500 |
| GGGGTTGACA CAGATCCCA   | TACCAACACC GGATATGTCA | TAATTAAGAA | 1550 |
| GCCTCTTGAT TTTGAAACAG  | CAGCTGTTTC CAACATTGTG | TTCAAAGCAG | 1600 |
| AAAATCCTGA GCCTCTAGTG  | TTTGGTGTGA AGTACAATGC | AAGTTCTTTT | 1650 |
| GCCAAGTTCA CGCTTATTGT  | GACAGATGTG AATGAAGCAC | CTCAATTTTC | 1700 |
| CCAACACGTA TTCCAAGCGA  | AAGTCAGTGA GGATGTAGCT | ATAGGCACTA | 1750 |
| AAGTGGGCAA TGTGACTGCC  | AAGGATCCAG AAGCTCTGGA | CATAAGCTAT | 1800 |
| TCACTGAGGG GAGACACAAG  | AGGTTGGCTT AAAATTGACC | ACGTGACTGG | 1850 |
| TGAGATCTTT AGTGTGGCTC  | CATTGGACAG AGAAGCCGGA | AGTCCATATC | 1900 |
| GGGTACAAGT GGTGGCCACA  | GAAGTAGGGG GGTCTTCCTT | AAGCTCTGTG | 1950 |
| TCAGAGTTCC ACCTGATCCT  | TATGGATGTG AATGACAACC | CTCCAGGCT  | 2000 |
| AGCCAAGGAC TACACGGGCT  | TGTTCTTCTG CCATCCCTTC | AGTGCACCTG | 2050 |
| GAAGTCTCAT TTTCGAGGCT  | ACTGATGATG ATCAGCACCT | ATTTCGGGGT | 2100 |
| CCCCATTTTA CATTTTCCCT  | CGGCAGTGGA AGCTTACAAA | ACGACTGGGA | 2150 |
| AGTTTCCAAA ATCAATGGTA  | CTCATGCCCG ACTGTCTACC | AGGCACACAG | 2200 |
| ACTTTGAGGA GAGGGCGTAT  | GTCGTCTTGA TCCGCATCAA | TGATGGGGGT | 2250 |
| CGGCCACCCT TGGAAGGCAT  | TGTTTCTTTA CCAGTTACAT | TCTGCAGTTG | 2300 |
| TGTGGAAGGA AGTTGTTTCC  | GGCCAGCAGG TCACCAGACT | GGGATACCCA | 2350 |
| CTGTGGGCAT GGCAGTTGGT  | ATACTGCTGA CCACCTTCT  | GGTGATTGGT | 2400 |
| ATAATTTTAG CAGTTGTGTT  | TATCCGCATA AAGAAGGATA | AAGGCAAAGA | 2450 |
| TAATGTTGAA AGTGCTCAAG  | CATCTGAAGT CAAACCTCTG | AGAAGCTGA  | 2499 |

【図面の簡単な説明】

【図1】 プラスミドpP S J 1 7 9の制限酵素部位および機能地図の模式図である。

【図2】 プラスミドpP S J 1 8 9の制限酵素部位および機能地図の模式図である。

【図1】

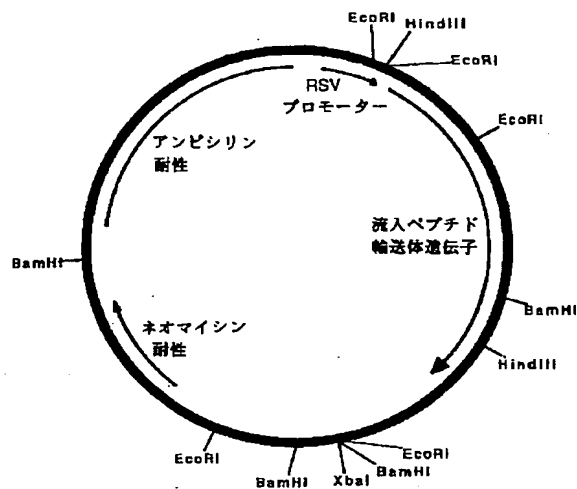


FIG. 1

プラスミド pPSJ179

【図2】

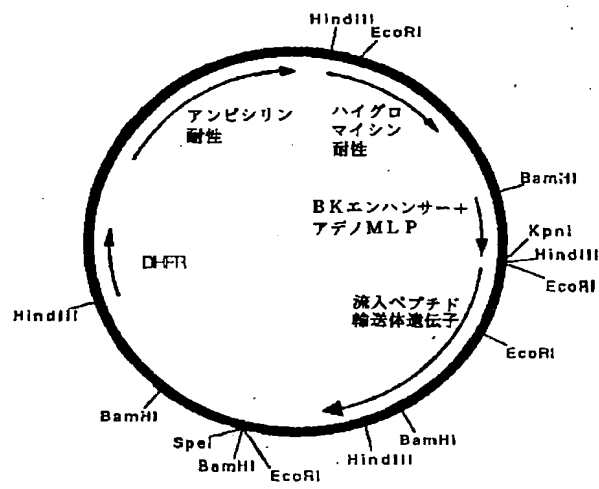


FIG. 2

プラスミド pPSJ189

フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号  
 C 1 2 Q 1/02 6807-4 B  
 //(C 1 2 P 21/02  
 C 1 2 R 1:91)

(72) 発明者 ジョアン・ホスキンス  
 アメリカ合衆国46256インディアナ州イン  
 ディアナポリス、ターン・コート8229番

F I

技術表示箇所

(72) 発明者 ポール・ルーサー・スカットラッド  
 アメリカ合衆国46143インディアナ州グリ  
 ーンウッド、レイク・クロッシング2412番